

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07438

研究課題名(和文) HTLV-1ウイルス遺伝子産物の組織内同定法の開発とその病理学的意義の解明

研究課題名(英文) A new diagnostic algorithm using biopsy specimens in adult T-cell leukemia/lymphoma: combination of RNA in situ hybridization and quantitative PCR for HTLV-1

研究代表者

加留部 謙之輔 (Karube, Kennosuke)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20508577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)の組織内、細胞内におけるヒトT細胞白血病ウイルス(Human T-cell leukemia virus, HTLV-1)の関与及び局在の同定を目的とした。結果として、HTLV-1ウイルスが産生するHBZのmRNAに対するin situ hybridization(HBZ in situ法)により、ATL腫瘍標本におけるウイルス粒子の同定が可能になった。さらに、HBZ in situ法の感度、特異度を明らかにするために定量PCRによるHTLV-1ウイルスゲノムの定量、及びサザンブロットによるウイルスの宿主ゲノムへの組み込みの実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATLLの診断のためにはHTLV-1ウイルスの存在を証明する必要があるが、これまで手技が煩雑で生検体が必要なサザンブロット法が主流であった。今回の研究によりホルマリン固定標本でもウイルスの検出が可能になったことで、ATLLの病理学的診断における迅速性、正確性が大きく高まったと言える。さらに、病変組織中で直接ウイルスを「見る」ことができることで、ATLLの病態解明にも大きく貢献したと言える。

研究成果の概要(英文)：Histopathological distinction between adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and other T-cell neoplasms is often challenging. Here we developed a new diagnostic algorithm for the accurate diagnosis of ATLL using FFPE samples. This method combines two HTLV-1 detection assays, namely, ultrasensitive RNA in situ hybridization using RNAscope for HTLV-1 bZIP factor (HBZ-RNAscope), and quantitative PCR targeting the tax gene (tax-qPCR). As a result, tax-qPCR had a higher ATLL identification rate than HBZ-RNAscope (88% [52/59], and 63% [39/62], respectively). However, HBZ-RNAscope clearly visualized the localization of HTLV-1-infected tumor cells and its identification rate increased to 94% (17/18) when the analysis was limited to samples up to 2 years old, indicating its usefulness in the daily diagnosis. This method is expected to replace Southern blot hybridization (SBH) and increase the accuracy of the diagnosis of ATLL.

研究分野：人体病理学

キーワード：成人T細胞白血病/リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞性白血病/リンパ腫(Adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL)は human T cell leukemia virus -1 (HTLV-1)の感染を原因として発症するリンパ系腫瘍であるが、その臨床的特徴は均一ではない。現在、4つの臨床病型(くすぶり型、慢性型、急性型、リンパ腫型)に分けられており、特にリンパ腫型、急性型は進行が早く、1年生存率が約50%と予後不良である。ATLLの腫瘍細胞は主に末梢血、リンパ節、皮膚に浸潤する。急性型は末梢血、リンパ腫型はリンパ節と、病変の主座が異なるが、両者で抗体療法やインターフェロン療法に対する反応性が異なるとの報告もあり、ATLL がその病変部位によって性質が異なることを示唆している。末梢血と異なり、リンパ節や皮膚における腫瘍細胞に特異的な遺伝子異常、発現異常はほとんど解析されていない。これは、末梢血に比べ、リンパ節や組織はホルマリン固定標本や凍結標本として保存する施設が多く、腫瘍細胞のみを取り出すのに必要な新鮮細胞としての検体保存が、手技の煩雑さやコスト面から、十分にできていないためと考えられた。

## 2. 研究の目的

ATLL において、浸潤臓器の違い、つまりは腫瘍微小環境の違いに応じた腫瘍細胞の生物学的特徴の違いを明らかにし、それに基づく ATLL の新規診断法、治療法につなげることを目的とする。具体的には、琉球大学における沖縄県 ATLL バイオバンクを活用し、組織内における ATLL 腫瘍細胞の新規同定法の開発を行った。

## 3. 研究の方法

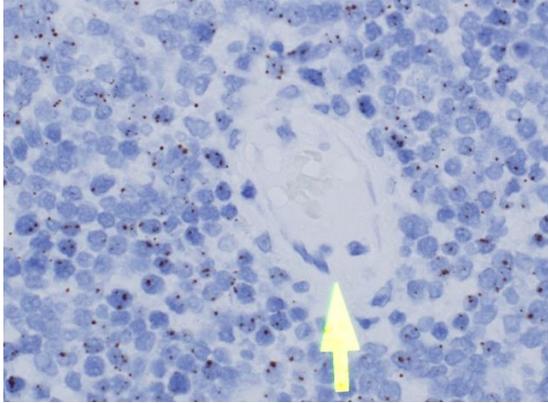
成人 T 細胞白血病/リンパ腫(Adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL)の組織内、細胞内におけるヒト T 細胞白血病ウイルス(Human T-cell leukemia virus, HTLV-1)の関与及び局在の同定のため、本研究はウイルス関連遺伝子である HBZ に対する RNA *in situ* hybridization(HBZ-ISH)法および tax 遺伝子の定量 PCR(tax-qPCR)法を併用し、SBH 法の代替法としての有用性を検討した。

## 4. 研究成果

結果として、HTLV-1 ウイルスが産生する HBZ の mRNA に対する *in situ* hybridization(HBZ *in situ* 法)により、ATL 腫瘍標本におけるウイルス粒子の同定が可能になった(図 1)。さらに、定量 PCR による HTLV-1 ウイルスゲノムの定量の実験系を確立した(図 2)。続いてこれら 2 つの解析法について、SBH 法の代替法としての有用性を検討した。ATLL53 例、HTLV-1 キャリア 38 例を含む非 ATLL 症例 54 例で解析を行った。HBZ-ISH 法は ATLL53 例中 33 例(62%)でウイルス感染細胞の局在と浸潤範囲の把握が可能であった。一方、tax-qPCR 法は、100 有核細胞中の HTLV-1 プロウイルス量のカットオフ値を 10%とすると、ATLL53 例中 47 例(89%)で陽性と判定でき、キャリア検体は全例陰性であった。両者を組み合わせた診断アルゴリズムによって、95% (102/107 例)で解析可能であり、感度および特異度ともに 100%で ATLL を鑑別できた(図 3)。今回の研究成果は日常の病理診断においてすぐに応用できるものであり、実際に ATLL の確定診断に活用されている。さらには、組織中におけるウイルスの分布を把握できるようになったため、ATLL の病態の新しい側面を観察できるようになった。今回の研究成果として別記の論文を発表した。

ID : A18-2.10

DNA conc. : 58.0 ng/ $\mu$ L



• HTLV-1 provirus/ 100 cells	
β-globin 2 copies = 1 cell	
↓	9.4
細胞100コあたりのウイルス量	
• HTLV-1 provirus (n=3)	
単位 : copies/ 30 ng DNA	37,41,30
• β-globin (n=3)	
単位 : copies/ 30 ng DNA	656,875,802

図 1. HBZ in situ

図 2. HTLV-1 定量報告

## サザンブロットを用いないATLLの新規診断アルゴリズム

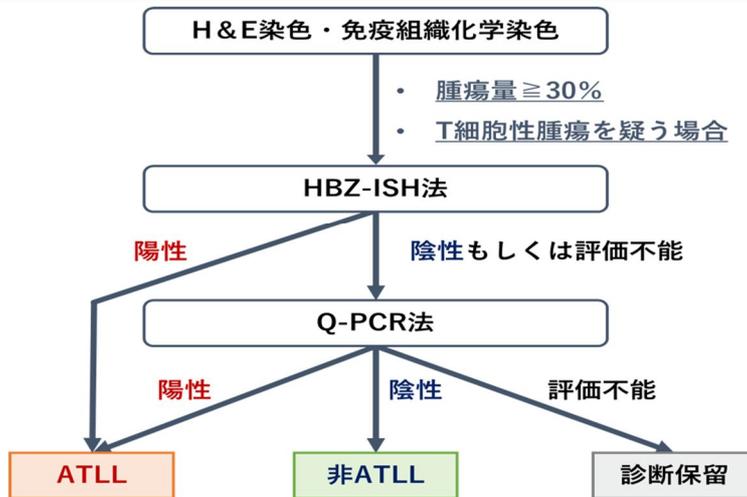


図 3 ATLL の新規診断アルゴリズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Karube K, Takatori M, Sakihama S, Tsuruta Y, Miyagi T, Morichika K, Kitamura S, Nakada N, Hayashi M, Tomori S, Nakazato I, Ohshiro K, Imaizumi N, Kikuti YY, Nakamura N, Morishima S, Masuzaki H, Fukushima T.	4. 巻 5
2. 論文標題 Clinicopathological features of Adult T-cell leukemia/lymphoma with HTLV-1-infected Hodgkin & Reed-Sternberg-like cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 198-206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020003201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takatori M, Sakihama S, Miyara M, Imaizumi N, Miyagi T, Ohshiro K, Nakazato I, Hayashi M, Todoroki J, Morishima S, Masuzaki H, Fukushima T, Karube K.	4. 巻 34
2. 論文標題 A new diagnostic algorithm using biopsy specimens in adult T-cell leukemia/lymphoma: combination of RNA in situ hybridization and quantitative PCR for HTLV-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-020-0635-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takatori M, Sakihama S, Miyara M, Imaizumi N, Miyagi T, Ohshiro K, Nakazato I, Hayashi M, Todoroki J, Morishima S, Masuzaki H, Fukushima T, Karube K.	4. 巻 34
2. 論文標題 A new diagnostic algorithm using biopsy specimens in adult T-cell leukemia/lymphoma: combination of RNA in situ hybridization and quantitative PCR for HTLV-1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-020-0635-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------